

ヒト神経膠腫における第10染色体上の癌抑制遺伝子の解析

著者	昆 博之
号	1669
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/22008

氏 名（本籍）
こん 昆 ひろ 博 ゆき 之

学 位 の 種 類
博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号
医 博 第 1 6 6 9 号

学位授与年月日
平 成 12 年 3 月 23 日

学位授与の条件
学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻
東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）外科学系専攻

学 位 論 文 題 目
ヒト神経膠腫における第10染色体上の癌抑制遺伝子の解析

（主 査）
論文審査委員
教授 吉 本 高 志 教授 柴 原 茂 樹
教授 堀 井 明

論文内容要旨

【目 的】

神経膠腫発生進展に関連すると考えられる第10染色体短腕上の未知の癌抑制遺伝子の存在領域の限局化を目的として、構造解析と生物学的手法である機能解析との二つの異なった解析法を用いて検討した。また10q23領域に同定された新規癌抑制遺伝子 *PTEN/MMAC1* の神経膠腫における変異も併せて解析し、第10染色体欠失との関連を検討することによって、短腕上に想定される癌抑制遺伝子の、神経膠腫発生進展における意義について考察した。

【方法及び結果】

1. 構造解析による第10染色体短腕上共通欠失領域の同定；神経膠腫79症例について、腫瘍特異的な第10染色体の共通欠失領域を求めるために、マイクロサテライトを検出する第10染色体上の多型マーカーを40個用いてヘテロ接合性の消失の有無を検討し、第10染色体の詳細な染色体欠失地図を作成した。それぞれのマーカーの位置関係は radiation hybrid panel を使用し決定した。79症例中37症例でヘテロ接合性の消失を認めたが、20例は全欠失例であり、共通欠失領域の限局化について情報が得られた部分欠失例は17例であった。部分欠失例はその欠失領域のパターンから3群に分類された。内訳は長腕領域のみ欠失しているもの6例、短腕領域のみ欠失しているもの4例、長腕、短腕の両方とも欠失しているものが7例であった。短腕領域の染色体欠失地図から、短腕の遠位部に2ヶ所の共通欠失領域を同定した。それぞれ10p15のD10S1691からD10S1649におよぶ5.6cMの領域と10p14のD10S585からD10S1664までの5.5cMの領域であった。

2. 機能解析による第10染色体短腕上癌抑制遺伝子存在領域の同定；ヘテロ接合性の消失の有無を検討する構造解析だけでは、当該領域をさらに限局化するのは困難であったため、機能解析として細胞工学的手法を用いて、癌抑制遺伝子が存在する領域の限局化を行った。ヒト第10染色体を有するヒト-マウスハイブリッド細胞HA(10)Aから微小核移入法を用いて、第10染色体の全体または一部を第10染色体の片側アレルが欠失している神経膠腫培養細胞(T98G)に移入し、様々な第10染色体断片を有する細胞クローン16個を得た。それらの増殖能を解析するため、軟寒天培地中でのコロニー形成能の有無を検討した。16個中13個のクローンで明らかにコロニー形成能は抑制されていた。これらの細胞クローンに導入された第10染色体断片の構造解析を行った結果、コロニー形成能の抑制を示す染色体領域がD10S594とD10S570の間の約25cMの領域(10p14-15)であることを明らかにした。

3. 構造解析と機能解析結果の融合；ヘテロ接合性の消失の有無の検討で求めた 10p15 の共通欠失領域の全域と、10p14 の共通欠失領域の一部は、軟寒天培地中でのコロニー形成の抑制をみとめた細胞クローンに共通して導入されていた第 10 染色体領域に含まれており、構造解析、及び機能解析という 2 つの異なった実験で合致する結果となった。以上の結果から、本領域において神経膠腫の発生、進展に関与している未知の癌抑制遺伝子の存在が強く示唆された。

4. *PTEN/MMAC1* 遺伝子異常の解析；PCR-SSCP 法を用い、第 10 染色体短腕の欠失と 10q23 に存在する新規癌抑制遺伝子 *PTEN/MMAC1* の変異との関係を神経膠腫 79 症例について検討した。8 例（grade IV 6 例，grade III 2 例）に *PTEN/MMAC1* の変異を認めた。これら 8 例とも第 10 染色体長腕領域にヘテロ接合性の消失を認めた。変異の内訳はナンセンス変異 4 例，ミスセンス変異 2 例，インフレーム欠失 1 例，スプライシング変異 1 例であった。このうちミスセンス変異，インフレーム欠失を認めた 3 症例は，テンシンホモログドメイン（codon 15-185），あるいはフォスファテースドメイン（codon 90-141）領域に変異が存在し，*PTEN/MMAC1* を不活性化している可能性が考えられた。第 10 染色体短腕にのみ部分欠失領域を持つ 4 症例では *PTEN/MMAC1* にはいずれも変異を認めなかった。神経膠腫には *PTEN/MMAC1* の変異とは関係なく，第 10 染色体短腕上の遺伝子変異によって発生，進展する経路が存在することが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は神経膠腫の発生，進展に最も大きな関係を有していると想定されている第 10 染色体異常に関して，構造解析，機能解析の 2 つの異なる方法を用いて検討を行い，その短腕上に存在すると予測される癌抑制遺伝子存在範囲を限局化している。

近年分子生物学の進歩に伴い，神経膠腫の発生，進展に多数の遺伝子異常が関与していることが判明してきた。この中で第 10 染色体異常は神経膠腫が悪性化する段階で極めて大きな役割を果たしていることが分かってきた。既に第 10 染色体長腕には PTEN/MMAC1 という重要な癌抑制遺伝子が存在していることが報告されている。本研究ではこの遺伝子異常とは全く別に，第 10 染色体短腕上に共通の遺伝子欠失領域が存在することを，手術標本 79 例というまとまった症例を用いて構造解析により明らかとした。本文中にも述べられているように，神経膠腫における第 10 染色体の異常はほとんどが全欠失を示し，共通欠失領域をさらに限局化するには数百例といった莫大な標本を必要とすることが予想され，マイクロサテライトマーカーを用いたヘテロ接合性の消失の有無による検討には限界があった。ここに細胞工学的手法を導入した点が興味深い。微少核移入法という先進的な方法により，第 10 染色体短腕上の共通欠失領域に，腫瘍増殖を抑制する機能を持った，すなわち癌抑制遺伝子が存在することを証明している点で大きな意義があると言える。またこの第 10 染色体短腕上に想定される癌抑制遺伝子異常は，長腕上に存在する PTEN/MMAC1 とは全く別の機構で神経膠腫の発生，進展に関与していることを確認しており，神経膠腫の病態解明に寄与するものと考えられる。

以上，本研究は方法，考察とも明解，秀逸であり，博士論文に充分値するものと考えられる。